基于转录组数据高通量发掘扶桑绵粉蚧微卫星引物

罗 梅, 张 鹤, 宾淑英, 林进添*

(仲恺农业工程学院外来有害生物预警与控制研究所,广州 510225)

摘要:【目的】扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 是我国重要的检疫性害虫。简单重复序列(simple sequence repeat,SSR)研究在遗传图谱和物理图谱的构建、分子标记辅助育种、品种鉴定、基因定位、遗传多样性、动植物分类和进化等方面具有重要意义。筛选的 SSR 引物将为扶桑绵粉蚧遗传多样性分析、进化分析及入侵生物学等奠定基础。【方法】利用高通量搜索的方法对扶桑绵粉蚧转录组中 28 120 条 unigenes 的数据进行搜索。【结果】共找到 1 781个 SSR 位点。扶桑绵粉蚧转录组中 SSRs 的主要重复类型是单核苷酸重复,占 SSR 总数的 89.44%;其次是三核苷酸重复,占 SSR 总数的 7.52%。单核苷酸重复里主要是 A/T 基序,占了总量的 87.42%。基于筛选的 SSRs,运用 Primer 3 软件进行引物的批量设计,共有 481 个 unigenes 成功设计引物,共设计出 1 228 对引物。【结论】研究表明利用扶桑绵粉蚧转录组数据开发 SSR 标记是可行的,本研究开发的引物将为扶桑绵粉蚧遗传多样性分析、进化分析及入侵生物学等奠定基础。

关键词: 扶桑绵粉蚧; 转录组; 简单重复序列; 微卫星 DNA; 引物

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2014)04-0395-06

High-throughput discovery of SSR genetic markers in the mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae), from its transcriptome database

LUO Mei, ZHANG He, BIN Shu-Ying, LIN Jin-Tian* (Institute for Management of Invasive Alien Species, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract:【Aim】*Phenacoccus solenopsis* Tinsley is one of the most important quarantine pests in China. Simple sequence repeats (SSRs) are very useful molecular markers in genetic studies such as genetic mapping, physical mapping, marker-assisted breeding and species identification, gene location, genetic diversity, classification and evolution of plants and animals, *etc*. Screening SSR primers will provide an important resource for marker-assisted investigation in genetic diversity, phylogenetic analysis and biological invasion of *P. solenopsis*.【Methods】A high-throughput method was used to develop the SSR genetic markers from the 28 120 unigenes of the transcriptome in the mealybug *P. solenopsis*.【Results】In total, 1 781 SSR genetic markers were developed from the previously constructed transcriptome database. The majority of them contained mono- and trinucleotide motifs (89.44% and 7.52%, respectively), of which A/T was the most abundant mononucleotide motif (87.42%). Based on the identified SSRs, 1 228 pairs of primer sets were designed from 481 unigenes by the Primer 3 program.【Conclusion】Our study shows that it is feasible to develop SSR markers by using *P. solenopsis* transcriptome, and the primers developed in this study provide the foundation for the analysis of genetic diversity, evolutionary biology, and invasion biology of *P. solenopsis*.

Key words: *Phenacoccus solenopsis*; transcriptome; simple sequence repeats; microsatellite DNA; primer

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)又称微卫星 DNA 或者短串联重复序列,一般以 1 ~ 6 个碱基为核心序列。SSR 遗传位点广泛分布于生物体中,多态性十分丰富。SSR 标记具有数量多、分

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201103026)

作者简介: 罗梅, 女, 1984 年 5 月生, 广东韶关人, 硕士, 实验师, 主要从事入侵生物研究, E-mail: 08luomei@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: linjtian@163.com

收稿日期 Received: 2013-12-30; 接受日期 Accepted: 2014-03-31

布广、多态性高、共显性、易检测和无放射性等优点，已广泛用于遗传图谱和物理图谱的构建、分子标记辅助育种、品种鉴定、基因定位、遗传多样性、动植物分类和进化等方面的研究(Powell *et al*., 1996)。随着新一代高通量测序技术的发展以及测序成本的下降，转录组学及其他组学迅速发展，利用转录组序列开发 SSR 标记应运而生。该方法既有 EST-SSR 标记的优点，同时其海量的数据为 SSR 标记的开发提供了比 EST-SSR 更全面的信息，提高了遗传多样性研究的准确性。国内外学者利用现代分子生物技术对昆虫的遗传变异、起源、入侵及扩散等种群问题进行了研究，其中微卫星作为一类重要的分子标记被成功运用到种群遗传的研究工作中(吴仲真等，2011)。

扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 隶属半翅目(Hemiptera)，粉蚧科(Pseudococcidae)，绵粉蚧属 *Phenacoccus*，是我国重要的检疫害虫。该虫最早发现于美国(Tinsley, 1898; Cockerell, 1902)，随后逐步扩展至北美洲墨西哥、南美洲、非洲、澳洲、欧洲和亚洲等地(Cockerell, 1902; Williams and de Willink, 1992; Kosztarab *et al*., 1996; Williams, 2004; Culik and Gullan, 2005; Hodgson *et al*., 2008; Akintola and Ande, 2008)。1991 年，在美国发现扶桑绵粉蚧可以危害棉花，引起了人们的高度关注。该虫无论对常规棉还是 Bt 棉都可严重危害。2005 年，在印度和巴基斯坦等地已经发现扶桑绵粉蚧对棉花的生产造成了重大的损失(Hodgson *et al*., 2008; Akintola and Ande, 2008)。由于该虫的危害，巴基斯坦 Punjab 地区在 2006 年的棉花产量减产了 12%，2007 年减产高达 40%，且在该地区两个月内耗费的农药费用就超过了 1.2 亿美元(Akintola and Ande, 2008; Arif *et al*., 2009)。扶桑绵粉蚧在我国最早于 2008 年广州的园林植物扶桑上报道(马骏等，2009)。该虫目前已在我国广东、广西、海南、浙江、云南、福建、江西、湖南、湖北、安徽、新疆、上海等省市的局部地区报道。扶桑绵粉蚧的繁殖能力很强，寄主范围十分广，寄主植物包括农作物、园林植物、杂草和灌木等 53 科 154 种，且有进一步扩大的趋势(Arif *et al*., 2009)。Chu 等(2009)通过对扶桑绵粉蚧线粒体细胞色素氧化酶 I (mtCOI)序列进行分析，显示该虫复合种存在隐存谱系。目前，其不同地理种群的遗传分化，我国地理种群的来源尚有待进一步的分析，而尚未见扶桑绵粉蚧微卫星引物的发表。为此，作者基于本课题组利用新一代的高通量测序技术获得的扶桑绵粉蚧转录组数据(未发表)，利用计算机的辅助进行大规模转录组 SSR 标记的发掘，同时对其组成、分布及特征进行了分析，以期为开发新的扶桑绵粉蚧功能基因组 SSR 标记提供理论依据，为扶桑绵粉蚧的入侵生物学提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试虫来源和 DNA 提取

用于验证 SSR 引物的 2 个扶桑绵粉蚧种群分别从棉花和番茄 2 个不同寄主收集而来。分别取扶桑绵粉蚧种群样品(各 30 头)迅速放入液氮冷冻后保存于 -70℃ 冰箱备用。混合种群样品的 DNA 提取参照 TaKaRa 基因组抽提试剂盒说明书(TaKaRa, 日本)进行。

1.2 转录组数据

扶桑绵粉蚧转录组数据为仲恺农业工程学院外来有害生物预警与控制研究所前期测序获得的 28 120 条 unigenes，总的 cDNA 碱基读取量约为 1 180 Mb。

1.3 SSR 鉴定

对扶桑绵粉蚧的 28 120 条 unigenes 利用在线微卫星位点扫描工具 SSRIT (Simple Sequence Repeat Identification Tool)(Temnykh *et al*., 2001)查找 SSR 位点。查找标准：重复单元长度设为 1，2，3，4，5 和 6 bp，最小重复次数分别为 12，6，5，5，4 和 4，且 SSR 位点侧翼序列长度≥100 bp。

1.4 SSR 引物设计与验证

基于筛选的 SSRs，运用 Primer 3 软件(Untergrasser *et al*., 2012)进行引物的批量设计。目标扩增片段设置为必须包含 SSR 起始 -3 bp，终止 +6 bp。引物的最适合大小为 22 bp，最小长度、设置为 18 bp，最大长度设置为 25 bp，引物最大允许有一个不能识别的碱基；扩增片段大小为 70 ~ 300 bp，引物最适合的退火温度(Tm)为 60℃，引物最小的 Tm 设置为 55℃，引物最大的 Tm 设置为 65℃，上下游引物间的 Tm 差异最大允许 3℃，引物末端稳定性最大为 250。

为了验证所设计的引物，从里面选了 10 对引物进行验证，以扶桑绵粉蚧 DNA 为模板，加入 10 × rTaq DNA 聚合酶反应缓冲液 2.5 μL (含 Mg^{2+})，正向引物和反向引物各 1 μL (10 mol/L)，10 mmol/L dNTPs 1 μL，*rTaq* DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U/μL)，

加 ddH_2O 至 25 μL，混匀，离心，放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序为：94℃变性 3 min；接着进行 35 个循环，循环条件为 94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 5 min。循环完毕后，72℃保温 10 min。PCR 产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺电泳进行分析。

2　结果与分析

2.1　扶桑绵粉蚧转录组中 SSR 位点的分布特点

利用软件 SSRIT 对扶桑绵粉蚧转录组中 28 120 条 unigenes 的数据进行搜索，共找到 1 781 个 SSR 位点，分布在 1 629 条 unigenes 中，发生频率（含有 SSR 的 unigene 数量与总 unigene 数量之比）为 5.79%。其中 1 487 条 unigenes 序列只含有 1 个 SSR 位点，含 2 个及 2 个以上 SSR 位点的 unigene 序列有 142 条，SSR 的分布频率（SSR 个数与总 unigene 数量比）为 6.33%。这些 SSR 基序包含 1 ~ 5 bp 的串联重复序列。

扶桑绵粉蚧转录组中 SSR 的主要重复类型是单核苷酸重复，占 SSR 总数的 89.44%；其次是三核苷酸重复，占 SSR 总数的 7.52%；再次是二核苷酸重复，占 SSR 总数的 2.31%；四核苷酸和五二核苷酸重复的含量很少，只占 0.73%（表 1）。89.44% 的单核苷酸重复里主要是 A/T 基序，占了总量的 87.42%；C/G 基序占 2.02%；其他基序占比例超过 1% 的只有 AT/AT，AAC/GTT 和 AAT/ATT，其比例分别为 1.07%，1.29% 和 2.13%。其余基序所占比例均不超过 1%。其中 AAGT/ACTT，AATC/ATTG，AATT/AATT，ACGT/ACGT，AGAT/ATCT 和 AATCG/ATTCG 基序均只有 1 个，占总量的 0.06%（表 2）。

扶桑绵粉蚧转录组 SSR 重复单元的重复次数分布在 5 ~ 19 次之间。其中 5 ~ 9 次重复的有 188 个 SSRs，占 10.56%；10 ~ 14 次重复的有 1 342 个 SSRs，占 75.35%；大于 15 次重复的有 251 个 SSRs，占 14.09%（图 1）。重复次数主要集中在 10 ~ 14 之间。单核苷酸单元最多重复 19 次，二核苷酸单元最多重复 9 次，三核苷酸单元最多重复 7 次，四、五核苷酸单元最多重复都为 5 次（表 1）。

表 1　基于重复单元数目中 SSRs 在扶桑绵粉蚧转录组中的出现频率

Table 1　Frequency of SSRs based on the number of repeat units in *Phenacoccus solenopsis* transcriptome

重复类型 Repeat type	重复次数 Number of repeats												合计 Total	百分比 Percentage
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15		
单核苷酸 Mononucleotide	–	–	–	–	–	640	294	173	118	117	75	176	1 593	89.44
二核苷酸 Dinucleotide	–	24	8	7	2	–	–	–	–	–	–	–	41	2.31
三核苷酸 Trinucleotide	84	26	24	–	–	–	–	–	–	–	–	–	134	7.52
四单核苷酸 Tetranucleotide	12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	12	0.67
五核苷酸 Pentanucleotide	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	0.06
总计 Total	97	50	32	7	2	640	294	173	118	117	75	176	1 781	
百分比 Percentage	5.45	2.81	1.80	0.39	0.11	35.93	16.51	9.71	6.63	6.57	4.21	9.88		

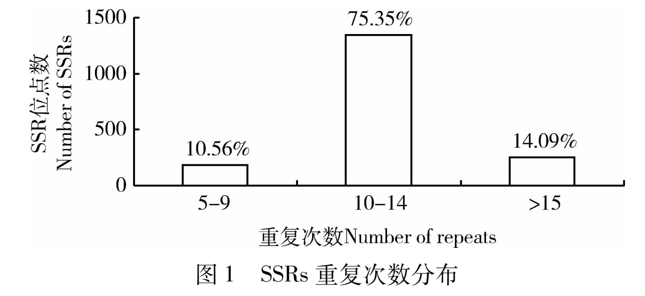


图 1　SSRs 重复次数分布

Fig. 1　Distribution of the number of repeats of SSRs

2.2　扶桑绵粉蚧 SSR 引物设计

基于筛选的 SSRs，运用 Primer 3 软件进行引物的批量设计，按照我们设置的参数，共有 481 个 unigenes成功设计引物，共设计出 1 228 对引物。随机挑选 10 对引物对扶桑绵粉蚧 DNA 进行扩增，结果表明，8 对引物能扩增出清晰条带，2 对引物没有扩增产物。在 10 对特异性引物中，6 对（60%）PCR 扩增产物与预期大小相符合，有 2 对（20%）扩增产物长度超过预期（表 3）。其中随机挑选的引物中，引物 3 和 10 未能成功扩出条带，引物 6 和 8 扩增的条带比预测的稍大一些（图 2）。

表 2 基于基序类型中 SSRs 在扶桑绵粉蚧转录组中的出现频率

Table 2 Frequency distribution of SSRs based on motif types in *Phenacoccus solenopsis* transcriptome

SSR 基序 SSR motif	重复数 Number of repeats												合计 Total	百分比 Percentage
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15		
A/T	–	–	–	–	–	628	287	170	114	113	73	172	1 557	87.42
C/G	–	–	–	–	–	12	7	3	4	4	2	4	36	2.02
AC/GT	–	5	1	1									7	0.39
AG/CT	–	9	1	5									15	0.84
AT/AT	–	10	6	1	2								19	1.07
AAC/GTT	18	3	2										23	1.29
AAG/CTT	10	2	3										15	0.84
AAT/ATT	21	11	6										38	2.13
ACC/GGT	4	2	1										7	0.39
ACG/CGT	13	3	1										17	0.95
ACT/AGT	2		1										3	0.17
AGC/CTG	3	1	4										8	0.45
AGG/CCT			3										3	0.17
ATC/ATG	7	3	2										12	0.67
CCG/CGG	6	1	1										8	0.45
AAAG/CTTT	3												3	0.17
AAAT/ATTT	4												4	0.22
AAGT/ACTT	1												1	0.06
AATC/ATTG	1												1	0.06
AATT/AATT	1												1	0.06
ACGT/ACGT	1												1	0.06
AGAT/ATCT	1												1	0.06
AATCG/ATTCG	1												1	0.06

表 3 SSR 引物的特征

Table 3 Characterization of selected SSR primers

编号 No.	Unigene ID	引物序列 Primer sequence	产物大小(bp) Product size	基序和重复数 Motif and repeat number	PCR 扩增 PCR amplification
1	327705	F：TTTTTGGAACGTGTCTTGTTTG R：GTTCTTTCTTCCAAGGGTGATG	249	(A)11	S
2	667673	F：TTTTTCGGTGTTCAGTTTTGTG R：GTAATCTCCCTCCTCTTCCGTG	130	(TTA)5	S
3	968526	F：TTTTTCATTCACATTCCCAGTG R：GGAAAATGAAATTTCCAATTATATG	94	(T)10	U
4	1049229	F：TTTTGCCGAGTCTTATGTTTTG R：AAGGTTTTGCCCATACTTCTCA	233	(A)13	S
5	165487	F：TTTTGAGCAAATTCCACGAATA R：TTAAAAGGTGGATCTTGGGTTG	127	(A)12	S
6	1186473	F：TTTTCATCCTCTTCTTCGTCGT R：TAGGCAACACTCTTCGTTGAGA	285	(TCG)5	S
7	889846	F：TTTTACAAAATACACTTCGCGG R：AGCAAGGATGGTGTAAAGGAAG	288	(A)10	S
8	724484	F：TTTGTCAGCTGAGCATAAAGGA R：ACAAGCTTGAGGATAATTTGCG	136	(A)10	S
9	1284511	F：TTTGCAACTGAAATTGGAACAC R：CTTCATTTTCTTTTGCATGCTG	179	(A)11	S
10	363647	F：TTTGATTGCATATAAATACGGTAGG R：TTGTAACAAATCAGTCGATAATGAA	108	(T)12	U

S：成功扩增 Successful amplification；U：未扩增出条带 Unsuccessful amplification.

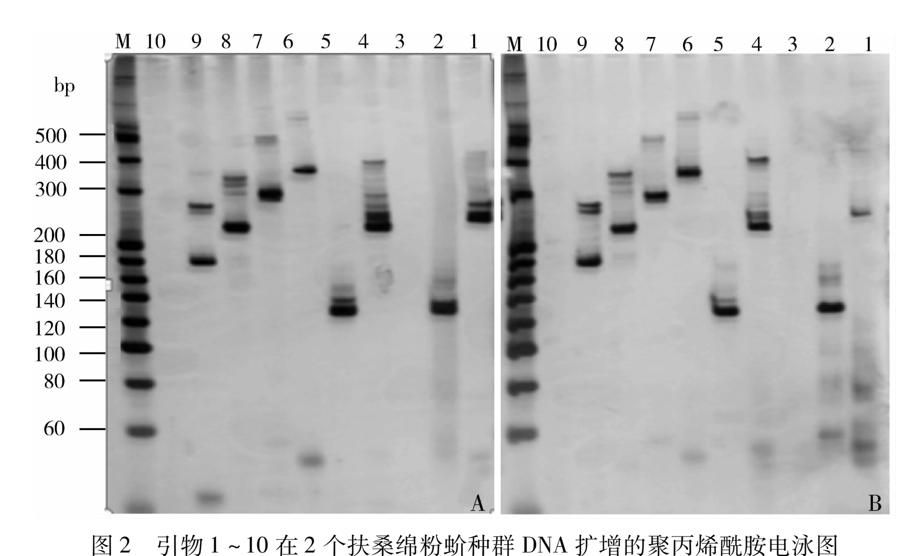


图 2　引物 1 ~ 10 在 2 个扶桑绵粉蚧种群 DNA 扩增的聚丙烯酰胺电泳图

Fig. 2　DNA amplification products of two *Phenacoccus solenopsis* populations amplified by primer sets 1 – 10 using polyacrylamide electrophoresis

A：寄主为棉花的扶桑绵粉蚧种群 *P. solenopsis* population from cotton host；B：寄主为番茄的扶桑绵粉蚧种群 *P. solenopsis* population from tomato host. M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker；1 – 10：引物 1 – 10（Primer 1 – 10）.

3　讨论

扶桑绵粉蚧转录组中微卫星的种类较为丰富，1 ~ 5 核苷酸重复类型都有出现，主要重复类型为单核苷酸重复，占 SSR 总数的 89.44%；其次是三核苷酸重复，占 SSR 总数的 7.52%。一般来说，在 ESTs 里，除了单核苷酸重复最多以外的是三核苷酸重复（Xu *et al.*, 2012），这与我们的结果一致。研究发现，扶桑绵粉蚧转录组 SSR 重复基元以单核苷酸为最多。从出现的频率来看，各种不同的重复基元出现最多的是 A/T，占 87.42%；其次分别是 AAT/ATT 和 G/C，分别占 2.13% 和 2.02%。这种倾向与 Zhu 等（2013）在黄粉虫上的研究是相一致的。

在合成的 10 对引物中有 2 对引物扩增片段与预期产物片段大小不符，大于预期产物片段长度，这可能与扩增片段中插入内含子有关（Saha *et al.*, 2004）。这 8 对具有多态性的引物重复单元为单核苷酸和三核苷酸重复，但是从我们扩增的结果来看，单核苷酸重复基序的扩增多态性比三核苷酸重复基序的丰富。这验证了低级单元 SSR 的多态性普遍比高级单元的高（Dreisigacker *et al.*, 2004）这一推断。在我们随机筛选的两对引物并不能扩增出条带，推测 DNA 片段里可能刚好在引物的片段中间可能插入了内含子。虽然我们筛选了引物，但仍需要运用筛选的引物做进一步的遗传多样性等分析。

微卫星对于基因调控、转录及蛋白功能有重要的作用（Borstnik and Pumpernik, 2002）。微卫星在不同基因组中存在的数量和方式特征及它们的作用都是在适应进化而存在（Karaoglu *et al.*, 2005; Kashi and King, 2006）。本研究表明利用扶桑绵粉蚧转录组数据开发 SSR 标记是可行的，本研究开发的引物将为扶桑绵粉蚧遗传多样性分析、进化分析及入侵生物学等奠定基础。

参考文献（References）

Akintola AJ, Ande AT, 2008. First record of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) on *Hibiscus rosa-sinensis* in Nigeria. *Agric. J.*, 3(1): 1 – 3.

Arif MI, Rafiq M., Ghaffar A, 2009. Host plants of cotton mealybug (*Phenacoccus solenopsis*): a new menace to cotton agroecosystem of Punjab, Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 163 – 167.

Borstnik B, Pumpernik D, 2002. Tandem repeats in protein coding regions of primate genes. *Genome Res.*, 12: 909 – 915.

Chu D, Liu GX, Fu HB, Xu W, 2009. Phylogenetic analysis of mt COⅠ reveals the cryptic lineages in *Phenacoccus solenopsis* complex (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52 (11): 1261 – 1265. [褚栋, 刘国霞, 付海滨, 徐卫, 2009. 线粒体细胞色素氧化酶Ⅰ(mt COⅠ)序列分析揭示扶桑绵粉蚧复合种存在隐存谱系. 昆虫学报, 52(11): 1261 – 1265]

Cockerell TDA, 1902. Two new mealybugs from New Mexico. *Can. Entomol.*, 34(2): 315 – 316.

Culik MMP, Gullan PJ, 2005. A new pest of tomato and other records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Espírito Santo, Brazil. *Zootaxa*, 964: 1 – 8.

Dreisigacker S, Zhang P, Warburton ML, Van Ginkel M, Hoisington D, Bohn M, Melchinger AE, 2004. SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different megaenvironments. *Crop Science*, 44(2): 381-388.

Hodgson C, Abbas G, Arief MJ, Saeed S, Karar H, 2008. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae), an invasive mealybug damaging cotton in Pakistan and India, with a discussion on seasonal morphological variation. *Zootaxa*, 1913: 1-35.

Karaoglu H, Lee CMY, Meyer W, 2005. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 22: 639-649.

Kashi Y, King DG, 2006. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet.*, 22: 253-259.

Kosztarab M, 1996. Scale insects of Northeastern North America: Identification, Biology, and Distribution. Virginia Museum of Natural History, Martinsville, Virginia. 499-501.

Ma J, Hu XN, Liu HJ, Liang F, Zhao JP, Feng LX, Chen NZ, 2009. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley was found on Chinese hibiscus *Hibiscus rosa-sinensis* in Guangzhou. *Plant Quarantine*, 3(2): 35-36. [马骏, 胡学难, 刘海军, 梁帆, 赵菊鹏, 冯黎霞, 陈乃中, 2009. 广州扶桑上发现扶桑绵粉蚧. 植物检疫, 3(2): 35-36]

Powell W, Machray GC, Provan J, 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1: 215-222.

Saha MC, Mian MAR, Eujay I, Zwonitzer JC, Wang LJ, May GD, 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theor. Appl. Genet.*, 109(4): 783-791.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S, 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.*, (11): 1441-1452.

Tinsley JD, 1898. Notes on Coccidae, with descriptions of new species. *Can. Entomol.*, 30: 317-320.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG, 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115.

Williams DJ, 2004. The Mealybugs of Southern Asia. The Natural History Museum, London. 896 pp.

Williams DJ, de Willink MCG, 1992. Mealybugs of Central and South America. CAB International, Wallingford, UK. 635 pp.

Wu ZZ, Li HM, Bin SY, Shen JM, He HL, Luo M, Ma J, Lin JT, 2011. Analysis of genetic diversity of different populations of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) using microsatellite markers. *Acta Entomologica Sinica*, 54(2): 149-156. [吴仲真, 李红梅, 宾淑英, 申建梅, 贺华良, 罗梅, 马骏, 林进添, 2011. 应用微卫星标记分析不同桔小实蝇种群的遗传多样性. 昆虫学报, 54(2): 149-156]

Xu Y, Zhou W, Zhou Y, Wu J, Zhou X, 2012. Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Sogatella furcifera* (Horvath) in response to southern rive black-streaked dwarf virus. *PLoS ONE*, 7(4): e36238.

Zhu JY, Wu GX, Yang B, 2013. High-throughput discovery of SSR genetic markers in the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), from its transcriptome database. *Acta Entomologica Sinica*, 56(7): 724-728. [朱家颖, 吴国星, 杨斌, 2013. 基于转录组数据高通量发掘黄粉甲微卫星引物. 昆虫学报, 56(7): 724-728]

(责任编辑: 袁德成)